

## 様式 C-19

# 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月14日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570218

研究課題名（和文）フグ胚をモデルとした真骨魚類ゲノム重複による転写制御進化の解析

研究課題名（英文）Evolutionary analysis of duplicated genes enhancer in teleost lineage by using fugu embryos.

研究代表者

黒川 大輔 (KUROKAWA DAISUKE)

東京大学・大学院理学系研究科・助教

研究者番号：40342779

研究成果の概要（和文）：クサフグを用いて、これまで実験発生的なアプローチが難しかった *Takifugu* 属フグに外来遺伝子の導入によるトランスジェニック魚の作成や、モルフォリノオリゴの顕微注入による遺伝子破壊等の実験手法を導入し、真骨魚類特異的ゲノム重複により倍加した *Otx2a*, *Otx2b* 遺伝子の機能、およびその転写調節についての解析を行うことにより、遺伝子重複が進化に与える影響を解析した。

研究成果の概要（英文）：We compared the organizer enhancer activities between Fugu *Otx2a* and *Otx2b* which are duplicated by teleost specific genome duplication. For this purpose, we adapted the successful induction of reporter gene DNA and morpholino antisense oligo molecules into the fertilized eggs of *Takifugu niphobles* (Kusafugu). The feasibility to perform transgenesis is an important step to establish *T. niphobles* as new model in evolution and developmental research.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：Otx, ゲノム, フグ, 発生進化

### 1. 研究開始当初の背景

(1) トラフグのゲノムサイズは約4億塩基対と脊椎動物で最も小さいことから、ゲノムプロジェクトが最も早く立ち上がった脊椎動物の一つであり、2002年からゲノム情報が公開されていた。

(2) ゲノムサイズが小さいため転写調節領域のスクリーニングに好適で、他の真骨魚類から形態的に大きく進化したトラフグは転写調節と形態進化の関係について解析する

モデルとして注目されていたが、重要な水産資源のため漁業権等の関係で基礎生物学的研究はほとんど進んでいなかった。また(3)項に述べる近縁種も含め、日本近海にしか生息しないため、欧米では胚の入手自体が難しく、形態形成に関わる遺伝子の研究は他のモデル動物からは大きく立ち遅れており、遺伝子の発現パターンが数例報告されているのみであった。また遺伝子導入技術等の実験発生的手法は全く導入されていなかった。

(3) トラフグ属にはトラフグ以外に約25

種が知られており、それらを交雑させた雑種一代目同士でも妊性を示す事が報告されている。すなわち、トラフグ属のフグはお互いに家系と見なせるほど遺伝的に近縁である事が明らかになっていた。

(4) 研究代表者が勤務する東京大学 三崎臨海実験所付近の海岸では5-7月にトラフグ属のクサフグが産卵の為に海岸付近にやって来て簡単に採集できる。クサフグは食用に適さず商品価値が無いので安価に手に入れる事が出来る。

(5) これらのクサフグ成熟個体から卵と精子を得て人工授精を行ったところ、正常に発生し孵化まで至った。

(6) クサフグゲノムの塩基配列を公開されているトラフグゲノム情報と比較した所、99%以上の配列が一致しており、トラフグゲノム情報がそのままクサフグの遺伝子クローニング等に利用可能な事が示された。

以上のように、形態進化を理解する上で注目すべき特徴を持ち、ゲノム情報まで整備されているにもかかわらずフグ胚の実験発生学的アプローチは全く進んでいなかった。

## 2. 研究の目的

1.項に述べた状況をふまえ、トラフグのゲノム情報が利用可能で、研究代表者が勤務する東大 三崎臨海実験所において、安価に大量に入手可能なクサフグ胚を用いて、

(1) Otx2 遺伝子のフグ胚内での機能と、魚類特異的に生じたゲノム重複が進化に与えた影響を理解する事を第一の目標とした。

(2) クサフグの産卵期は5-7月であり実験期間に限られる。トラフグでは産卵期以外にも卵成熟させる技術が確立しているため、これらの技術をクサフグに応用し、繁殖期以外に卵を得ることを試みるによりフグ胚の実験モデル動物としての一般化を第二の目標とした。

## 3. 研究の方法

(1) 真骨魚類特異的ゲノム重複によって倍加した Otx2a, Otx2b 遺伝子の発現パターンの違いを与える転写調節の違いをトランスジェニック クサフグを作成して解析した。

(2) モルフォリノオリゴによる遺伝子機能阻害を行い、二つの遺伝子の機能の違いを解析した。

(3) 水槽内でクサフグを飼育し、温度、日長等を調節し、繁殖期以外に卵成熟の誘導を試みた。

## 4. 研究成果

(1) フグ Otx2a, Otx2b 遺伝子のオーガナイザーにおける遺伝子発現調節領域を同定した。

真骨魚類は系統特異的なゲノム重複が生じている。それに伴い、多くの遺伝子も倍加している。研究代表者が、以前より研究して来た脊椎動物の頭部形態形成に重要な役割を果たす Otx2 遺伝子もフグ胚において Otx2a, Otx2b の二つの遺伝子に倍加している。クサフグ胚より、これら二つの遺伝子をクローニングし、時空間的な発現を解析した。

本申請研究では特に原腸胚期において、胚の前後軸誘導に重要な働きを持つ頭部オーガナイザー領域における Otx2 遺伝子の発現に注目した。四足動物では Otx2 遺伝子は頭部オーガナイザー領域に発現する事が知られており、例えばマウスでは前方臓側内胚葉、アフリカツメガエルにおいては背側の深部内胚葉で発現する事が知られている。真骨魚類初期原腸胚においては胚盾と呼ばれる構造(図1下段左側の矢印で示す領域)がオーガナイザーとして働く事が知られている。フグ胚においては Otx2b 遺伝子がこの領域に発現している(図1下段右側の矢印)のに対して、Otx2a 遺伝子はもっと後期にオーガナイザー領域由来の脊索前板に弱く発現するのみであった(図1上段右側の矢印)。以上の事からゲノム重複に伴い、Otx2 遺伝子の分業が生じている事が示唆された。

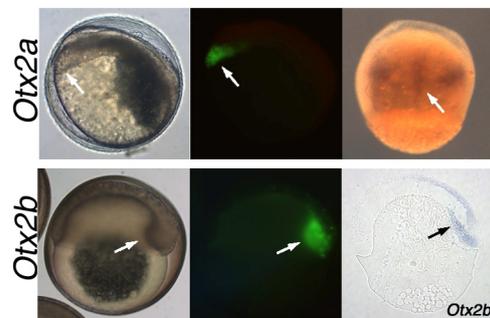


図1 上段:Otx2a の脊索前板における転写調節領域に EGFP 遺伝子を連結したレポーター遺伝子を導入したクサフグ初期体節期胚の明視野像(左)と蛍光観察像(中央)。脊索前板(矢印)に EGFP の発現が認められる。右側は80%エピボリー期胚の Otx2a 遺伝子の内在性の発現を示す。下段: Otx2b の胚順における転写調節領域に EGFP 遺伝子を連結したレポーター遺伝子を導入したクサフグ胚盾形成期の明視野像(左)と蛍光観察像(中央)。胚順(矢印)に EGFP の発現が認められる。右側は胚順形成期胚の Otx2b 遺伝子の内在性の発現(矢印)

これらの発現を司る転写調節領域を同定する為にトラフグゲノムより *Otx2a*, *b* 遺伝子の近傍の配列をクローニングし、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) 遺伝子に連結したレポーター遺伝子を作成した。これらのレポーター遺伝子を顕微注入法によりクサフグ受精卵に導入を試みた。ゼブラフィッシュやメダカといったレポーター遺伝子解析にもつばら用いられる実験モデル魚に比べて、フグ胚は授精膜が固く、遺伝子を注入する為のガラス針を貫通させる事が困難であったが、人工授精時に海水に還元剤を混入させる等の工夫により、授精膜の硬化を阻害することにより遺伝子注入に成功した(図1)。

他系統の脊椎動物の *Otx2* 遺伝子座との比較ゲノム解析等も併用し、*Otx2b* 遺伝子のオーガナイザー領域における転写調節領域を翻訳開始点上流 1000~800 塩基対に決定する事に成功した(図1 下段中央の矢印)。対して、*Otx2a* の脊索前板の発現を活性化させる転写調節領域は翻訳開始点下流 14400~15500 塩基対に存在し(図1 上段中央の矢印)、それぞれの転写調節領域に塩基配列の相同性は認められず、遺伝子が重複した後に独立にそれぞれの転写活性可能を獲得したことが予想された。

以上の結果は5項の主な発表論文等欄の③・⑤に示す雑誌論文に発表した。尚、図1に示すトランスジェニック技術を用いた外来遺伝子の発現はフグ胚においては世界初の報告である。

(2) フグ *Otx2b* 遺伝子の前後軸決定・頭部誘導における機能の解析。

(1) 項の解析を通じて確立したクサフグ受精卵への顕微注入法を用いて、アンチセンスモルフォリノオリゴの導入によりフグ胚の初期原腸胚における胚盾に発現する *Otx1a*, *Otx2b* 遺伝子のノックダウンを行った。それぞれの遺伝子単独のノックダウンでは明瞭な表現形は示されず、双方の遺伝子が相補的に機能している事が示唆された。*Otx1a/Otx2b* 双方のモルフォリノオリゴを同時に顕微注入するダブルノックダウンを試みた所、脊索前板の機能不全による頭部構造の異常が認められ、これらの遺伝子が頭部形成に重要な役割を果たす事が示された。またこれらの実験から、フグ胚でもメダカ・ゼブラフィッシュと同様にモルフォリノオリゴの導入により、遺伝子機能の抑制が可能である事が示された。現在、ダブルノックダウン胚の表現型解析を継続している。

(3) 産卵期以外に採集したクサフグを実験室内の水槽で長期飼育を試みた。水温を 16℃程度に維持して飼育した所、数ヶ月後に数匹の雌が抱卵したが排卵

には至らなかった。今後、排卵誘発ホルモン等を使用して排卵を誘導する事により、一年中、成熟卵を得られる条件を検討する予定である。

以上のように、クサフグ胚を材料にした *Otx* 遺伝子を発現調節機構の解析を通じて、「ゲノム重複によって生じた2つの遺伝子の転写調節の進化」について一定の成果を得、論文発表も行った。また、これらの解析を通じて、フグ胚に実験発生学的手法を用いる方法もほぼ確立し、「フグ胚の実験モデル動物化」にも一定の目処を得た。以上2点から、実験申請時に掲げた目標はほぼ達成できたと考える。

本申請計画は平成23年度で終了したが、研究代表者が所属する東大三崎臨海実験所はフグ集団産卵地に隣接し成熟個体や受精卵を容易に採集でき、大規模な飼育設備や宿泊施設を完備する等、外部研究者もフグ発生実験を行う事が可能である。このような研究環境を背景として、平成24年度以降も本研究で確立した実験技法を国内外の研究者に提供し、共同研究を展開して行く予定である。本申請研究に対する助成により、他国ではゲノム「情報」でしかないトラフグ全ゲノムデータに実験発生学的な意義を与え、わが国独自の科学コンテンツを発信することができたと確信する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Fumitaka Inoue, Daisuke Kurokawa, Maiko Takahashi, Shinichi Aizawa. *Gbx2* directly restricts *Otx2* expression to forebrain-midbrain, competing with Class III POU factors. *Mol. Cell Biol.* in press. (2012) (査読有り)

DOI:10.1128/MCB.00083-12

② Masahumi Kawaguchi, Yuki Sugahara, Tomoe Watanabe, Kouta Irie, Minoru Ishida, Daisuke Kurokawa, Shin-ichi Kitamura, Itsuki C. Handoh, Kei Nakayama, Yasunori Murakami.

Nervous system disruption and concomitant behavioral abnormality in early-hatched pufferfish larvae exposed to heavy oil. *Environmental Science and Pollution Research*, Special issue: ISTA15, in press. (2012) (査読有り)

DOI:10.1007/s11356-012-0833-0

③ Daisuke Kurokawa, Tomomi Ohmura, Koji Akasaka, Shinichi Aizawa. A lineage specific enhancer drives *Otx2* expression in teleost organizer tissues. *Mechanisms of Development*, 128, 653-661. (2012) (査読有り)  
DOI:10.1016/j.mod.2011.11.001

④ Takanori Shono, Daisuke Kurokawa, Tsutomu Miyake and Masataka Okabe. Acquisition of glial cells missing 2 enhancers contributes to a diversity of ionocytes in zebrafish. *PLoS ONE*, 6(8), e23746. (2011) (査読有り)  
DOI:10.1371/journal.pone.0023746

⑤ Daisuke Kurokawa\*, Tomomi Ohmura\*, Hajime Ogino, Masaki Takeuchi, Ai Inoue, Fumitaka, Inoue, Yoko Suda and Shinichi Aizawa. (\*These two authors contributed equally to this work.) Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm. *Developmental Biology*, 342, 110-20. (2010) (査読有り)  
DOI:10.1016/j.ydbio.2010.03.013

[学会発表] (計5件)

①一年魚の発生.

黒川大輔

日本発生生物学会 秋期シンポジウム 2011.  
愛知県・岡崎 2011年12月19日

②トランスジェニッククサフグを用いた真骨魚類で重複した *Otx2* 遺伝子の転写調節の解析.

黒川大輔, 大村朋美, 赤坂甲治, 相沢慎一  
日本動物学会 第82回大会  
北海道・旭川 2011年9月21日

③ Evolutionary origin of *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm. Society of for Developmental Biology 69th Annual meeting.  
Daisuke Kurokawa, Tomomi Ohmura, Hajime Ogino, Masaki Takeuchi, Fumitaka Inoue, Yoko Suda, Kazuki Nakao, Shinichi Aizawa.  
米国 アルバカーキ 2010年8月7日

④ Evolutionary origin of the *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm.  
Daisuke Kurokawa, Tomomi Ohmura, Hajime Ogino, Masaki Takeuchi, Fumitaka Inoue, Yoko Suda, Shinichi Aizawa.  
2<sup>nd</sup> Joint meeting of the French and Japanese Societies for Developmental Biology.

フランス パリ 2010年5月27日

⑤ Evolutionary Origin of *Otx2* enhancer for its expression in visceral endoderm.  
Daisuke Kurokawa, Tomomi Ohmura, Hajime Ogino, Masaki Takeuchi, Ai Inoue, Yoko Suda, Shinichi Aizawa.  
42<sup>nd</sup> Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists.  
新潟県・新潟市 2009年5月28日

[その他]

ホームページ等

<http://www.mmbs.s.u-tokyo.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

黒川 大輔 (KUROKAWA DAISUKE)  
東京大学・大学院理学系研究科・助教  
研究者番号: 40342779

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし